

世界知的所有権機関  
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類7</b> C12N 9/80, 15/55, 15/63, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, 1/34, C07K 16/40, G01N 33/53	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/58448</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年10月5日(05.10.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP00/01802  <b>(22) 国際出願日</b> 2000年3月24日(24.03.00)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/84743 1999年3月26日(26.03.99) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</b> 伊東 信(ITO, Makoto)(JP/JP) 〒819-0013 福岡県福岡市西区愛宕浜四丁目34-1 Fukuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54)Title: CERAMIDASE GENE</b>  <b>(54)発明の名称</b> セラミダーゼ遺伝子  <b>(57) Abstract</b> A neutral/alkaline ceramidase originating in a mammal; an antibody binding specifically thereto; a gene encoding this ceramidase; a probe and a primer hybridizable specifically therewith; a genetic engineering process for producing the ceramidase; a method for detecting the ceramidase or its gene; and a method for controlling the ceramide content in cells and/or tissues; which are usefully applicable to lipid engineering reagents for analyzing the structure and functions of ceramide, diseases in association with ceramide metabolism, etc.		

## (57)要約

哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼ；それに特異的に結合する抗体；  
該セラミダーゼをコードする遺伝子；それに特異的にハイブリダイズするプロー  
ブ及びプライマー；該セラミダーゼの遺伝子工学的な製造方法；該セラミダーゼ  
又は遺伝子の検出方法並びに細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節  
方法。本発明は、セラミドの構造や機能等を解析するための脂質工学用試薬、セ  
ラミドの代謝に関連する疾患等への応用に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GDB	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GEE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

## 明細書

### セラミダーゼ遺伝子

#### 技術分野

本発明は、セラミドの構造や機能等を解析するための脂質工学用試薬として有用な、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド、それに特異的に結合する抗体、該ポリペプチドをコードする遺伝子、それに特異的にハイブリダイズするプローブおよびプライマーに関する。また、本発明は、前記ポリペプチドの遺伝子工学的な製造方法、並びに該ポリペプチド又は遺伝子の検出方法及びそのキットに関する。さらに、本発明は、セラミド量の異常に起因する疾患への応用が可能な、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法に関する。

#### 背景技術

セラミダーゼは、スフィンゴ脂質の一種であるセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸に加水分解する酵素である。セラミドがセラミダーゼにより加水分解されて生成するスフィンゴイドは、プロテインキナーゼCの阻害、ホスホリパーゼDの活性化、カルモジュリン依存性の酵素の阻害等の種々の生理活性を有する。このように、前記スフィンゴイドは、細胞の増殖や細胞内情報伝達に関与することにより、細胞機能の調節に働いていると考えられている重要な物質である。セラミダーゼは、前記スフィンゴイドの量の調節という重要な役割を担う酵素である。

セラミダーゼは、その至適pHにより酸性セラミダーゼ、中性・アルカリ性セラミダーゼに分類される。これまで酸性域に至適pHを有するセラミダーゼの存在は、ラット脳【バイオケミストリー（Biochemistry）、第8巻、第1692～1698頁（1969）】、モルモット上皮細胞【ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ストリー (J. Biol. Chem.)、第270 巻、第12677 ～12684 頁 (1995) ]、ヒト腎臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta)、第398 巻、第125 ～131 頁 (1975) ]、脾臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ、第1004巻、第245 ～251 頁 (1989) ]、繊維芽細胞 [バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)、第205 巻、第419 ～425 頁 (1982) ]、上皮 [フェブス・レターズ (FEBS Lett.)、第268 巻、第110 ～112 頁 (1990) ]等の哺乳動物組織、ヒト尿 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第270 巻、第11098 ～11102 頁 (1995) ]等に報告されている。

また、シュードモナス属細菌がセラミダーゼを生産することが明らかにされており、該セラミダーゼは、アルカリ性域に至適pHを有するセラミダーゼである [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273 巻、第14368 ～14373 頁 (1998) ]。

これらのセラミダーゼのうち、ヒト尿より精製された酸性セラミダーゼのアミノ酸配列及び該セラミダーゼをコードする遺伝子の塩基配列が決定されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第271 巻、第33110 ～33115 頁 (1996) ]。また、前記ヒト尿由来の酸性セラミダーゼ遺伝子との相同性を利用してマウスの酸性セラミダーゼ遺伝子が得られている [ジェノミックス (Genomics)、第50巻、第267 ～274 頁 (1998) ]。

しかしながら、報告されている哺乳類由来セラミダーゼ遺伝子は、いずれも酸性セラミダーゼをコードするものであり、哺乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列や遺伝子構造は全く知られておらず、高等生物における中性・アルカリ性セラミダーゼの生物学的機能も明らかにされていないのが現状である。

生体内におけるセラミドの機能の解明、その代謝の制御、セラミドに関連した疾病の診断、治療等の研究には、セラミドに関連する種々の酵素、並びに該酵素の遺伝子に関する詳細な情報を得る必要がある。しかしながら、上記のように哺乳

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列、その遺伝子に関する知見は得られていないのが現状である。したがって、セラミドに関連する上記のような技術を開発するためには中性・アルカリ性セラミダーゼ、特にその遺伝子に関する知見を得る必要がある。

上記のように、哺乳類のセラミダーゼ遺伝子のクローニングについて、いくつかの報告があるが、これらはいずれも酸性領域で活性を示すセラミダーゼであり、中性・アルカリ性で活性を示すセラミダーゼとの間には高いホモロジーを期待できない。このため、酸性セラミダーゼ遺伝子の塩基配列のホモログとして中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を取得することは困難である。

#### 発明の開示

本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、第1の目的は、哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を提供することにある。本発明の第2の目的は、前記遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体を用いる遺伝子工学的に高純度の中性・アルカリ性セラミダーゼを製造する方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、前記遺伝子がコードするポリペプチドを提供することにある。本発明の第4の目的は、本発明の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAを提供することにある。本発明の第5の目的は、本発明の遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを提供することにある。本発明の第6の目的は、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片を提供することにある。本発明の第7の目的は、前記セラミダーゼ又はその遺伝子の検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。本発明の第8の目的は、細胞内または組織内におけるセラミド量の調節方法を提供することにある。

本発明者らは、哺乳類であるマウス肝臓から、中性・アルカリ性セラミダーゼを単離し、その遺伝子を単離することに成功した。また、ハイブリダイゼーショ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ンやポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）などの手法を用いることにより、ヒトを含む哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼの構造を解明することに成功した。更に該遺伝子を用いて、遺伝子工学的手法により高純度な中性・アルカリ性セラミダーゼを簡便に製造することにも成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、

〔１〕 （Ａ）配列表の配列番号：１４に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

（Ｂ） 配列表の配列番号：１５に記載の塩基配列又はその一部を有する核酸であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

（Ｃ） 配列表の配列番号：１４に記載のアミノ酸配列において、少なくとも１つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

（Ｄ） 配列表の配列番号：１５に記載の塩基配列において、少なくとも１つの塩基の欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；並びに

（Ｅ） 前記（Ａ）～（Ｄ）いずれか記載の核酸の相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、

（Ｆ） 縮重を介して、前記（Ａ）～（Ｅ）いずれか記載の核酸とは異なる塩基配列を有する核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、

からなる群より選択された核酸の塩基配列を有する遺伝子；

〔２〕 前記〔１〕記載の遺伝子を含有してなる組換えDNA；

〔３〕 前記〔１〕記載の遺伝子または前記〔２〕記載の組換えDNAを含有し

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

てなる、微生物、動物細胞又は植物細胞用発現ベクター；

〔４〕 前記〔３〕記載の発現ベクターを保持してなる形質転換体；

〔５〕 セラミダーゼ遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプチドの生産に適する条件下に、前記〔４〕記載の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法；

〔６〕 配列表の配列番号：１４に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチド；

〔７〕 前記〔１〕記載の遺伝子によりコードされてなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド；

〔８〕 前記〔１〕記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA；

〔９〕 前記〔１〕記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA；

〔１０〕 前記〔８〕記載のアンチセンスDNAを含有してなる発現ベクター；

〔１１〕 前記〔１〕記載の遺伝子又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー；

〔１２〕 前記〔６〕又は〔７〕記載のポリペプチドに特異的に結合しうる抗体又はその断片；

〔１３〕 前記〔１１〕記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出方法；

〔１４〕 前記〔１１〕記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを含有してなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出に用いるためのキット；

〔１５〕 前記〔１２〕記載の抗体又はその断片を使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出方法；

〔１６〕 前記〔１２〕記載の抗体又はその断片を含有してなるセラミダーゼ活

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

性を有するポリペプチドの検出に用いるためのキット；並びに

〔17〕 前記〔1〕記載の遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することを特徴とする、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、セラミダーゼの至適pHを示す図である。

第2図は、セラミダーゼ遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

中性・アルカリ性セラミダーゼのコンセンサス配列などの情報が明らかではなかったため、本発明者らは、前記中性・アルカリ性セラミダーゼを単離してアミノ酸情報を得、それにより初めて前記セラミダーゼをコードする遺伝子を単離することができた。

これにより、本発明のマウス肝臓由来中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列は、シュードモナス属細菌〔シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)〕由来の既知のアルカリ性セラミダーゼ〔前出ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368～14373頁(1998)〕のアミノ酸配列との相同性が低いという驚くべき知見をも得ることができた。

本発明のセラミダーゼは、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼとして初めて明らかにされたものである。従って、本発明は、公知のシュードモナス属細菌由来の既知のアルカリ性セラミダーゼに比べて、生体内におけるセラミドの機能の解明、その代謝の制御、セラミドに関連した疾病の診断、治療等の開発により一層有用である。

以下、本発明を説明する。



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

### (1) セラミダーゼ活性を有するポリペプチド

本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」（本明細書においては、単にセラミダーゼと記載する場合がある）とは、前記のようにセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸とに加水分解する活性を有する酵素をいう。また、「中性・アルカリ性セラミダーゼ」とは、酸性領域よりも高いpHに至適pHを有するセラミダーゼをいう。

その一例として、本発明において単離精製されたマウス肝臓由来の中性・アルカリ性セラミダーゼの酵素化学的、理化学的性質を記載する。

#### 1. 作用

本発明のセラミダーゼは、セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成する。

なお、当該セラミダーゼの活性は、例えば、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第275巻、第3462～3468頁（2000）に記載の方法に従って測定することができる。すなわち、20  $\mu$ l の25 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中に550 pmolの、C12-NBD-セラミド〔アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）、第263巻、第183～188頁（1998）〕、1.0%（W/V）コール酸ナトリウム及び適当量の酵素（セラミダーゼ）を溶解した反応混合液を37℃にて30分間インキュベートする。反応液を沸騰水浴で5分インキュベートすることにより反応を停止する。得られた反応液を更に減圧乾固する。乾固物をクロロホルム/メタノール＝2/1（V/V）に溶解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィ（展開溶媒：クロロホルム/メタノール/25%アンモニア水＝90/20/0.5（V/V/V））で展開する。その後、CS-9300クロマトスキャナー（島津製作所製）を用い励起波長475 nm、蛍光波長525 nmで、上記の反応により生成したC12-NBD-脂肪酸の定量

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

を行なう。本酵素（セラミダーゼ）の1ユニット（U）は、上記の条件下で1分間あたり1  $\mu$ モルのC12-NBD-脂肪酸がC12-NBD-セラミドから加水分解されて放出されるのに要する酵素量と定義する。

## 2. 基質特異性

脂肪酸部分を $^{14}$ C放射性同位体で標識した各種スフィンゴ脂質100 pmolに対し、本発明のセラミダーゼ5 mUを1% コール酸ナトリウムを含む25 mMトリス-塩酸、pH 7.5緩衝液20 ml中で37°C、24時間作用させる。反応液はシリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開後、イメージングアナライザーBAS1000（富士フィルム社製）により $^{14}$ C-標識スフィンゴ脂質と、酵素反応によって生じた $^{14}$ C-標識脂肪酸とを検出定量し、得られた値から分解率を算出する。本発明のセラミダーゼの基質特異性を表1に示す。

本発明のセラミダーゼは、表1に示すように、①種々のN-アシルスフィンゴシンを加水分解する；②ガラクトシルセラミド、スルファチド、GM1a、スフィンゴミエリンには作用しない；③スフィンゲニン（d18:1）を含むセラミドに対して、スフィンガニン（d18:0）を含むセラミドより、よく作用する；④フィトスフィンゴシン（t18:0）を含むセラミドには作用しにくい等の基質特異性を示す。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

表 1

基質 (構造)	分解率 (%)
N-ラウロイルスフィンゴシン (C12:0/d18:1)	63
N-パルミトイルスフィンゴシン (C16:0/d18:1)	93
N-ステアロイルスフィンゴシン (C18:0/d18:1)	83
N-パルミトイルスフィンガニン (C16:0/d18:0)	59
N-ステアロイルスフィンガニン (C18:0/d18:0)	40
N-パルミトイルフィトスフィンゴシン (C16:0/t18:0)	5
N-ステアロイルフィトスフィンゴシン (C18:0/t18:0)	2
NBD-N-ドデカノイルスフィンゴシン (NBD-C12:0/d18:1)	97
NBD-N-ヘキサノイルスフィンゴシン (NBD-C6:0/d18:1)	2
ガラクトシルセラミド (Galb1-1' Cer)	0
スルファチド (HSO3-3Galb1-1' Cer)	0
GM1a (Galb1-3GalNAcb1-4(NeuAca2-3)Galb1-4Glcbl-1' Cer)	0
スフィンゴミエリン (Choline phosphate Cer)	0

## 3. 至適 pH

3.3-ジメチルグルタル酸、50 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、50 mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール) 20 ml 中、100 pmol の C12-NBD-セラミドに対し本発明のセラミダーゼ 16 mU を 37°C、24 時間作用させる。反応液は、シリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開する。ついで、CS-9300 クロマトスキャナーを用い、検出波長 525 nm で NBD-標識セラミドと、酵素反応で生じた NBD-標識脂肪酸とを検出定量し、得られた値から分解率を算出する。第 1 図は、C12-NBD-標識セラミド分解活性と pH の関係を示す図であり、縦軸は分解率 (%)、横軸は反応 pH を示す。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

。第1図の結果に示すように、本セラミダーゼの至適pHは、7.0～8.0である。

#### 4. 温度安定性

本発明のセラミダーゼは、0.1% ポリドカノール (polidocanol) (商品名：ルブロール (Lubrol) PX) を含む20mMトリス-塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37℃、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60℃、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下する。

#### 5. 分子量

本発明のセラミダーゼの分子量は、SDS-PAGE (還元条件下) により約94kDaである。またグリコペプチダーゼFにより消化された本酵素は、SDS-PAGE (還元条件下) により約73kDaである。

なお、本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」の一例としては、配列表の配列番号：14に示されたアミノ酸配列を有する、マウス由来の天然型セラミダーゼのポリペプチドが挙げられる。さらに、該アミノ酸配列を有するポリペプチドのみならず、上記のような方法での活性測定により同様のセラミダーゼ活性が認められるものであれば、配列表の配列番号：14に示されるアミノ酸配列中に1個以上のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入等の変異が導入されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」に包含される。また前記変異は、得られたポリペプチドがセラミダーゼ活性を呈しうる変異であれば、2種以上の変異が導入されていてもよい。なお、本明細書において、「変異が導入されたアミノ酸配列」は、人為的に変異を導入したアミノ酸配列及び天然由来の変異を有するアミノ酸配列のいずれをも包含する。

かかる変異を有するセラミダーゼは、具体的には、例えば、後述のセラミダーゼ遺伝子の塩基配列 (配列番号：15) において、変異を有する変異遺伝子につ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

いて、下記ステップ：

(a) 前記遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20  $\mu$ l の 25 mM トリス塩酸緩衝液（pH 6～9、好ましくは 6.5～8.5、より好ましくは 7～8、特に好ましくは 7.5）中、550 pmol の C12-NBD-セラミド、及び 1.0 %（W/V） コール酸ナトリウム〕中、37℃で30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに

(b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、

により、セラミダーゼ活性を示すポリペプチドを選択することにより得ることができる。

## (2) セラミダーゼ遺伝子

本発明においてセラミダーゼ遺伝子とは、上記の「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」をコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子、又は該遺伝子の塩基配列を含む核酸である。その一例としては、配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部からなるポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子、配列表の配列番号：15に記載の塩基配列又はその一部からなる核酸の塩基配列を有する遺伝子が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。このように、配列番号：14に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子又は配列番号：15に記載の塩基配列の一部からなる核酸の塩基配列を有する遺伝子であっても、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするものであれば、本発明の範囲に包含される。これらの遺伝子は、マウス肝臓由来中性・アルカリ性セラミダーゼの遺伝子であるが、本発明のセラミダーゼ遺伝子の起源は、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)と同様にして遺伝子産物のセラミダーゼ活性を検出されるものであれば特に限定されない。かかる起源としては、例えば、マウス、

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ラット、ヒト、ハムスター、モルモット等が挙げられる。

なお、本明細書において、「(アミノ酸配列の)一部からなるポリペプチド」とは、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)によりセラミダーゼ活性を検出できるものを意味する。

さらに、同様のセラミダーゼ活性を呈しうる、変異を有するセラミダーゼをコードする遺伝子も本発明に包含される。例えば、配列表の配列番号:15に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換等の変異が導入されたアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子であっても、該遺伝子にコードされるポリペプチドがセラミダーゼ活性を有するものであれば、本発明の遺伝子に含まれる。このように変異を有する天然由来の遺伝子のみならず人為的に作製された遺伝子であっても、中性・アルカリ性セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子であれば本発明の範囲に包含される。

上記のような、人為的に変異の導入された遺伝子の作製方法としては、例えば以下のような方法が使用される。

ランダムな変異を導入する方法としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換するトランジション変異を起こさせる方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・USA、第79巻、第1408～1412頁(1982)]、マンガンを含む反応液中でPCRを行い、DNA合成時のヌクレオチドの取り込みの正確さを低くする方法[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第224、第347～353頁(1995)]等を用いることができる。

部位特異的変異を導入する方法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法[ギャップド・デュプレックス(gapped duplex)法、ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research)、第12巻、第9441～9456頁(1984)]、*du t* (*dUTPase*)と*un g* (ウラシル-DNAグリコシラーゼ)遺伝子を欠

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

損した宿主を利用する方法 [クンケル (Kunkel) 法、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・USA、第82巻、第488～492頁 (1985)]、アンバー変異を利用したPCRによる方法 (国際公開第98/02535号パンフレット) 等を用いることができる。これらの方法で目的の遺伝子に部位特異的な変異を導入するための各種のキットが市販されており、該キットを利用することにより、所望の変異を導入された遺伝子を容易に取得することが可能である。

また、前記核酸の相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズする核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を有する遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。セラミダーゼ活性は、例えば、前記 (1) に記載のステップ (a) 及び (b) により検出することができる。

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば以下の条件をいう。すなわち、0.5% SDS、5×デンハルト [Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400] 及び100 µg/ml サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0) 中で、50℃で4時間～一晩保温を行う条件をいう。

また、ハイブリダイゼーション操作の詳細は、例えば、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.) に記載されている。

なお、縮重遺伝子コードを介して、前記核酸とは異なる塩基配列を有する遺伝子も本発明のセラミダーゼ遺伝子に含まれる。

なお、本発明の遺伝子によりコードされたポリペプチドは、前記 (1) に記載

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

のステップ（a）及び（b）により、セラミダーゼ活性が検出されるものであれば、本発明に含まれる。

本発明の遺伝子によれば、さらに種々の使用目的に適した組換えDNAが提供される。ここで、「組換えDNA」とは、遺伝子工学的手法により得られた、本発明の遺伝子を含有したDNAである。

本発明のセラミダーゼ遺伝子を含有した組換えDNAを公知のベクター等に連結し、セラミダーゼ遺伝子が発現可能な状態で挿入された発現ベクターを作製することができる。かかる発現ベクターも本発明に含まれる。

本発明において、発現ベクターとは、前記遺伝子または組換えDNAが挿入され、かつ所望の宿主細胞で発現するように構築されたベクターである。また、後述のアンチセンスDNAを挿入したベクターも本発明の発現ベクターに含まれる。挿入されるベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。プラスミドベクターとしてはpUC18、pUC19、pBluescript、pETなどの市販品が好適に使用でき、ファージベクターとしては、λgt10、λgt11等のラムダファージベクターなどの市販品が好適に使用できるが、これらに限定されるものではない。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等が使用できるが、これらに限定されるものではない。これらのベクターは、用いる宿主細胞に応じて、適宜選ばれる。かかるベクターには、誘導可能なプロモーター、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していてもよい。

また、使用目的によっては、単離精製が容易になるように、Hisタグ、GST融合タンパク質として発現しうる配列を有するベクターを用いてもよい。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（例えば、lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）融合タンパク質ベクター（例えば、pGEX



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

4 T) やタグ (例えば、Myc、His A など) 配列を有するベクターなどを用いることができる。

### (3) セラミダーゼ遺伝子を含有した形質転換体

本発明のセラミダーゼ遺伝子が挿入された発現ベクターで宿主の形質転換を行うことにより、本発明の形質転換体、すなわち本発明のセラミダーゼ遺伝子を発現する細胞を得ることができる。使用する宿主は、所望のセラミダーゼの使用目的により適宜選択することができ、大腸菌をはじめとする微生物、酵母の他、動物細胞、植物細胞、動物個体、植物個体等を用いることができる。具体的には、大腸菌としては、Escherichia coli K-12 系統の HB101 株、C600 株、JM109 株、DH5  $\alpha$  株、DH10B 株、XL-1BlueMRF' 株、TOP10F 株などが挙げられる。また、酵母細胞としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L、3T3、FM3A、CHO、COS、Vero、Hela などが挙げられる。植物細胞としては、タバコ BY2 などが挙げられる。

発現ベクターを宿主に導入する方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版、第249-254頁に記載の方法を用いることができる。次に、目的の遺伝子を発現する形質転換体を選択するためには、発現ベクターの特性を利用する。例えばプラスミドベクターが p Bluescript で、大腸菌を宿主細胞とする場合、アンピシリンを含むプレート上でアンピシリン耐性を有するコロニーを、あるいはアンピシリン、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド (X-Gal) 及びイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含むプレート上で、アンピシリン耐性を示し、かつ、白色を呈するコロニーを選択することにより外来遺伝子を導入されたコロニーを選別する。

本発明の形質転換体の培養を通常用いられる条件下で行なうことによって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを生産させることができる。なお、本発明

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

の遺伝子を発現させる宿主により、コドン使用頻度が異なり、発現が抑制される場合があるが、この場合、本発明の遺伝子に使用されるコドンを、それぞれの宿主に合わせたコドンにかえて用いてもよい。また、前記発現ベクターは、プラスミド由来のベクターのみに限定されるものではなく、本発明の目的を妨げないのであれば、ファージ、コスミド等由来のベクターを用いてもよい。本発明のポリペプチドを容易にかつ大量に製造する観点から、外来遺伝子を誘導発現させることが可能なベクター、レポーター遺伝子産物との融合蛋白質として発現させることが可能なベクター等が望ましい。

セラミダーゼの発現の確認は、セラミダーゼ活性を測定することにより行なうことができる。活性測定は、例えば、形質転換体の細胞抽出液を試料としてジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第275 巻、第3462～3468頁 (2000) に記載の方法、例えば、前記(1)に記載のステップ(a)及び(b)と同様の操作により行なうことができる。また、細胞内のセラミド量の測定によっても、セラミダーゼの発現の確認を行なうことができる。上記セラミド量の測定は、例えば、アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第244 巻、第291 ～300 頁 (1997) に記載の方法で行うことができる。また、セラミダーゼに対する抗体を使用することもできるが、セラミダーゼを他のポリペプチド (本発明のセラミダーゼを除くポリペプチド) との融合体として発現させる場合には、そのポリペプチド (本発明のセラミダーゼを除くポリペプチド) 部分に対する抗体を用いてもよい。抗体を使用する場合には、例えば形質転換体の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ポリビニリデンフルオリド (PVDF) 膜上に転写し、この膜上で抗体を用いて検出することができる。

#### (4) セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法

本発明は、本発明の遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

チドの生産に適する条件下に、上記の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造方法をも提供する。形質転換体の培養方法には、特に限定はなく、使用された宿主に適した公知の培養方法から適当なものを選択すればよい。

本発明の製造方法において、上記の形質転換体が微生物あるいは培養細胞である場合には、培地組成、培地のpH、培養温度、培養時間の他、インデューサーの使用量、使用時間等についてセラミダーゼの発現に最適な条件を決定することによって、効率よくセラミダーゼを生産させることができる。

形質転換体の培養物からセラミダーゼを精製するには通常の方法が用いられる。形質転換体が大腸菌のように細胞内にセラミダーゼが蓄積する場合には、培養終了後、遠心分離によって形質転換体細胞を集め、得られた細胞を超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等によって無細胞抽出液を得る。これを出発材料とし、塩析法その他、イオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィー等の一般的なタンパク質精製法により精製することができる。用いる宿主-ベクター系によっては発現産物が細胞外に分泌される場合があるが、このような場合は培養上清から同様に精製を行えばよい。

本発明の製造方法によれば、該セラミダーゼが細胞内に生産される場合、目的のセラミダーゼと細胞内の諸酵素、タンパク質などの夾雑物とが共存するが、これらの夾雑物は、発現されるセラミダーゼの量に比べて微量にすぎないため、その精製は極めて容易であるという優れた利点がある。また、ベクターとして細胞外分泌型のベクターを用いた場合、セラミダーゼが細胞外に分泌され、セラミダーゼを含む画分には、培地成分などが共存する。しかしながら、これらは通常セラミダーゼの精製の妨げとなるようなタンパク質成分をほとんど含まないため、例えば、マウス肝臓からのセラミダーゼの精製に必要であった煩雑な分離精製操作を必要としないという優れた利点がある。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

また、真核生物由来のセラミダーゼの場合、酵素自身に糖鎖を有している可能性があり、宿主細胞として糖鎖生合成能力を持たない細胞、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌のような原核生物、あるいは酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞の糖鎖生合成能力を失った変異細胞を用いることによって、糖鎖を持たないセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。更に、糖鎖を有する酵素を生産することも可能であり、この場合は、宿主細胞として、糖鎖生合成能力を有する細胞、例えば、酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞を用いることによって、糖鎖を持つセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。

また、用いる宿主-ベクター系によっては、発現産物が不溶性の封入体 (inclusion body) として形成されることがある。この場合、培養終了後に遠心分離によって細胞を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等を行なうことにより封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、通常用いられるタンパク質可溶化剤、例えば尿素やグアニジン塩酸塩等で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーを行なうことにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いたリフォールディング操作を行なうことによってセラミダーゼ活性を保持したポリペプチドを含む標品を得ることができる。必要に応じてこの標品を更に各種クロマトグラフィーによって精製すれば、高純度のセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを得ることができる。

#### (5) ハイブリダイゼーション用プローブ及びPCR用プライマー

本発明のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明の遺伝子、又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズしうる。かかるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の塩基配列をもとに設計し、例えば、常法により化学的に合成することにより作製されうる。該オリゴヌク

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

レオチドプローブの塩基配列には特に限定はないが、前記セラミダーゼ遺伝子、又は該遺伝子に相補的な塩基配列を有する核酸にストリンジントな条件下にハイブリダイズするものであればよい。上記「ストリンジントな条件」とは、特に限定されないが、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 $5 \times \text{デンハルト}$ 、 $100 \text{ mg/ml}$  ニシン精子DNAを含む溶液中、〔前記プローブの  $T_m - 25^\circ\text{C}$ 〕の温度で一晩保温する条件等をいう。また、上記のプライマーの塩基配列にも特に限定はなく、通常のPCRの反応条件において前記セラミダーゼ遺伝子、又は該遺伝子に相補的な塩基配列を有する遺伝子にアニーリングし、DNAポリメラーゼによる伸長反応を開始できるものであればよい。

オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーの  $T_m$  は、例えば、下記式：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G+C) - (600/N)$$

(式中、 $N$  はオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーの鎖長であり、 $\%G+C$  はオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー中のグアニン及びシトシン残基の含有量である)

により求められる。

また、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーの鎖長が18塩基より短い場合、 $T_m$  は、例えば、 $A+T$  (アデニン+チミン) 残基の含有量と  $2^\circ\text{C}$  との積と、 $G+C$  残基の含有量と  $4^\circ\text{C}$  との積との和  $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$  により推定することができる。

上記のオリゴヌクレオチドプローブの鎖長としては、特に限定はないが、非特異的なハイブリダイゼーションを防止する観点から、15塩基以上であることが好ましく、18塩基以上であることがさらに好ましい。

また、本発明のプライマーにおいても、前記オリゴヌクレオチドプローブと同様の塩基配列を有する核酸が挙げられる。例えば、本発明の遺伝子の塩基配列をもとに設計し、化学的に合成すること等により作製することができる。プライマーの鎖長には、特に限定はないが、例えば、15～40塩基の鎖長のものを使用

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

することができ、特に17～30塩基の鎖長のものを好適に使用することができる。前記プライマーはPCR法をはじめとする種々の遺伝子増幅法に使用することが可能であり、これによって、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出を行うことができる。

また、前記オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーとして、天然由来のセラミダーゼをコードする核酸を、制限酵素処理、エキソ型ヌクレアーゼ処理等の酵素的処理、超音波等の物理的処理等により断片化し、得られた断片を、アガロースゲル等に代表される各種核酸分離法により分離精製することにより得られた核酸を用いてもよい。前記のようにして得られた核酸は、セラミダーゼに特徴的な配列を有する領域由来であることが望ましい。

さらに、前記オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、検出対象の核酸をより容易に検出をおこなうために、公知の方法にしたがって適当な標識を施し、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出に使用することができる。標識には、特に限定するものではないが、放射性同位元素の他、蛍光物質、ビオチンやジゴキシゲニンのようなリガンドなどに代表される各種の標識をおこなってもよい。

本発明のハイブリダイゼーション用のプローブを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、又はゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNAをクローニングすることができる。

また、本発明のプライマーを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、又はゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーから、PCR法により本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNA断片を検出したり、さらにはその全長の遺伝子を得ることもできる。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

## (6) 遺伝子の検出方法

本発明の遺伝子の検出方法は、前記オリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを使用し検出用試料中の遺伝子を検出することを1つの大きな特徴とする。

本発明の検出方法においては、前記オリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーション法などにより遺伝子の検出を行なってもよく、また、前記プライマーを用いて、PCR法などのDNA増幅方法により遺伝子の検出を行なってもよい。

オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションの場合、検出用試料としては、例えば、微生物のコロニーや培養細胞、組織切片のような試料、これらの試料中のDNAやRNAを膜上に固定したもの、これらの試料から抽出されたDNAやRNAなどが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版等に記載の公知の方法にしたがって行なうことができる。当該ハイブリダイゼーションの条件は、用いるプローブの $T_m$ 値、標的DNAのGC含量などにより適宜決定することができる。例えば、前記モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の条件などを適用できる。

プライマーを用いて遺伝子の検出を行う場合、検出用試料としては、例えば、微生物培養液、微生物コロニー、微生物菌体のような微生物試料、培養細胞、組織、組織切片のような生体由来試料などが挙げられる。これらの試料は、例えば、単離した微生物や培養細胞をそのままの状態でもよく、適切な処置を施した状態で用いてもよい。また組織のような固体試料は浸出液や懸濁液を調製して使用することができる。また、これらの試料の上清又はこれらの試料について界面活性剤処理のような細胞溶解処理が施された試料やその上清も使用することができる。さらに、検出対象である核酸を損なわない範囲で試料中の他の成分を

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

除去する操作が施されていてもよい。

前記プライマーを用いてPCR法により検出を行なう場合、PCR条件は、用いるプライマーの $T_m$ 値、増幅し検出する対象の領域の長さなどにより、適宜選択することができる。PCR法では、増幅産物の有無を確認することにより目的の遺伝子を検出することができる。増幅の有無の確認法には特に限定はないが、例えば核酸増幅反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを適当な核酸染色試薬、例えばエチジウムブロマイド、サイバー・グリーンI (SYBER Green I) 等で染色し、紫外線を照射して生じるバンドの有無を検出することにより確認できる。バンドの検出は肉眼で観察してもよいが、例えば蛍光イメージアナライザー等を用いて検出することもできる。

本発明の遺伝子の検出方法においては、検出感度を上昇させるために、前記プローブ及びプライマーを併用してもよい。例えば、前記プライマーを用いて、PCR法により、試料中に微量に存在するセラミダーゼ遺伝子を増幅し、ついで、プローブを用いて該遺伝子とハイブリダイズさせることによって、高感度かつ正確に検出することができる。

本発明の検出方法によりセラミダーゼ遺伝子の検出を行ない、さらに該遺伝子の量を決定する場合には、ハイブリダイズしたプローブに由来するシグナルの強度、プライマーを用いて増幅された産物に由来するバンドの蛍光強度などを定量することにより行なうことができる。mRNAを測定対象としてその定量を行うことにより、目的遺伝子の発現量を調べることができる。

また、本発明の検出方法には、本発明の遺伝子の検出に用いるためのキットを使用することにより、より簡便に検出を行なうことができる。かかるキットも本発明に含まれる。前記キットは、上記のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又は上記のプライマーを含有してなることを1つの特徴とする。前記キットは、検出操作に使用される種々のコンポーネントを含んでもよく、例えば、オリゴヌクレオチドプローブを含むキットの場合には核酸を固定するための膜やハイブリダイ



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ゼーション緩衝液などに代表されるハイブリダイゼーション用の各種試薬、また、プライマーを含むキットの場合には耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP混合液、PCR用緩衝液などに代表されるPCR用試薬を含んでいてもよい。さらに、プローブや増幅されたDNAを検出するための試薬や微生物増殖用の培地、細胞培養用の培地、試料より核酸を抽出するための試薬などを含有してもよい。

(7) セラミダーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片は、該ポリペプチドに特異的に結合する能力を有するものであれば、特に限定はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えばヒト化抗体、Fabフラグメント、単鎖抗体等を使用することもできる。本発明の抗体は、例えば、1992年、ジョン・ワイリー & サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc) 発行、ジョン・E・コリガン (John E. Coligan) 編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー (Current Protocols in Immunology) に記載の方法により、本発明のポリペプチドの全部又は一部を用いてウサギやラット、マウス等を免疫することにより、容易に作製され得る。こうして得られた抗体を精製後、ペプチダーゼ等により処理することにより、抗体の断片が得られる。また、遺伝子工学的に抗体を作製することもできる。さらに、本発明の抗体又はその断片は、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などによる検出を容易にするために、各種修飾をしてもよい。

上記の抗体又はその断片には、ポリペプチドのある部分断片に特異的に結合しうるものも含まれる。

得られた抗体又はその断片の用途としては、セラミダーゼ生産菌の検出、セラミダーゼ発現細胞株の検出、培養細胞や組織中のセラミダーゼタンパク質の検出、アフィニティークロマトグラフィー、各種ライブラリー (ゲノムDNA又はc

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

DNA)の発現産物のスクリーニング、医薬、診断薬、研究用試薬等への応用が考えられる。

#### (8) ポリペプチドの検出方法

本発明のポリペプチドの検出方法は、前記抗体又はその断片を使用し、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを検出することを特徴とする。

本発明においては、検出用試料として、例えば、微生物や動物細胞の培養物、組織切片、微生物や動物細胞の細胞破砕物、皮膚等の組織の抽出液あるいは洗浄液、微生物や動物細胞、組織由来のタンパク質が固定された膜などのタンパク質試料を用いることができる。

抗体又はその断片の前記ポリペプチドへの特異的な結合の検出は、公知の方法が利用できるが、例えば、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などが挙げられる。

本発明のポリペプチドの検出方法には、本発明のポリペプチドの検出に用いるためのキットを使用することにより、より簡便に検出を行なうことができる。かかるキットも本発明に含まれる。前記キットは、上記の抗体又はその断片を含有してなることを特徴とする。また、該キットは反応用緩衝液、標識二次抗体、発色試薬などを含有してもよい。

#### (9) アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA

本発明において、「アンチセンスDNA」及び「アンチセンスRNA」とは、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はその一部と相補的な塩基配列を有し、内因性のセラミダーゼ遺伝子(ゲノムDNA及びmRNA)と2本鎖を形成することによって、該遺伝子からの遺伝子情報の発現(転写、翻訳)を抑制又は制御するものをいう。アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAの長さは、塩基配列の特異性や細胞内に導入する方法に応じて変えることが可能である。アンチセンスDN

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

A又はアンチセンスRNAは、合成機を用いて人工的に合成したり、本発明の遺伝子を鋳型とした酵素反応によって通常と逆の向き（アンチセンスの向き）に遺伝子を発現させること等により、作製することが可能である。生体内においてアンチセンスRNAの発現が望まれる場合には、本発明の遺伝子を通常とは逆の向きに接続した発現ベクターを構築し、これを生体内に導入すればよい。

例えば、t a t 遺伝子 [ヌクレイック アシドズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第19巻、第3359～3368頁 (1991)]、あるいはr e v 遺伝子 [プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシース オブ ザ U S A (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA)、第86巻、第4244～4248頁 (1989)] を利用したH I Vの増殖抑制等、アンチセンス技術は数多く知られており、従って、これらの方法により、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを用いて、内因性のセラミダーゼ遺伝子の発現を抑制又は制御することが可能である。また、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、in situ ハイブリダイゼーション等の研究試薬として利用可能である。

(10) セラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を用いた細胞内又は組織内におけるセラミド量の調節

本発明の遺伝子により、さらに細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法を提供することができる。かかる調節方法も本発明に包含される。本発明の細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法は、本発明のセラミダーゼ遺伝子を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することに1つの特徴がある。

即ち、本発明の調節方法においては、本発明のセラミダーゼ遺伝子を細胞又は組織中に導入し、該遺伝子により発現されたセラミダーゼにより、細胞又は組織中のセラミドが分解され、一方、本発明のセラミダーゼ遺伝子を、該遺伝子のア

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ンチセンス核酸、例えば、アンチセンスRNAが生成するような形で細胞、組織に導入することにより、当該細胞、組織中でのセラミダーゼ活性を低減し、セラミドの分解を抑制することができる。また、セラミド量を抑制する場合には、本発明のセラミダーゼ遺伝子のアンチセンス核酸、即ち、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAをそのままの形態で細胞又は組織に導入してもよい。

前記セラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞又は組織に導入する方法としては、公知の方法が使用でき、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等の物理的遺伝子導入方法や、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法を利用することができる。本発明の方法に使用できるウイルスベクターに特に限定はないが、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等を用いて導入することができる。

本発明の調節方法によれば、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入して、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することにより、セラミド量の異常に起因する疾患の治療を行なうことができ、またセラミド代謝異常の疾病モデル動物を作製することができるという優れた効果を奏する。「セラミド量の異常に起因する疾患」としては、特に限定されないが、例えば、ファーバー病等が挙げられる。

以下に、マウス肝臓由来セラミダーゼの遺伝子を取得する方法について説明する。

1) まず、マウス肝臓のホモジネートより膜画分を調製し、これをショ糖-EDTA液に懸濁して凍結融解した後、遠心分離を行って上清（粗酵素抽出液）を得る。この粗酵素抽出液より公知のタンパク質精製方法、例えば各種のクロマトグラフィーを組み合わせることで単一な状態に精製されたセラミダーゼ標品を得ることがで

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

きる。上記の精製に使用できるクロマトグラフィーとしては、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、キレーティングクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等を使用することができる。

2) 次にセラミダーゼ遺伝子をクローニングするためのプローブを作製するための情報として、セラミダーゼの部分アミノ酸配列を調べる。上記の精製セラミダーゼ標品をそのままエドマン分解法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第256巻、第7990～7997頁（1981）〕によるアミノ酸配列分析に供することにより、セラミダーゼのN末端アミノ酸配列を知ることができる。また、精製酵素標品を基質特異性の高いプロテアーゼ、例えばリジルエンドペプチダーゼやN-トシル-L-フェニルアラニルクロロメチルケトン（TPCK）-トリプシン等で消化して得られるペプチド混合物より適当なペプチド断片を精製し、該断片についてアミノ酸配列分析を行うことにより、セラミダーゼ内部の部分アミノ酸配列を得ることができる。

3) こうして明らかとなったアミノ酸配列の情報をもとに、ハイブリダイゼーション用のプローブ、又はPCR用のプライマーとして使用するためのオリゴヌクレオチドを設計し、本発明のセラミダーゼ遺伝子をクローニングする。そのためには、一般的に用いられるPCR又はハイブリダイゼーション法を利用する。PCR法は、1989年、ストックトン・プレス（Stockton Press）社発行、エルリッヒ H. A.（Erlich, H.A.）編集、PCRテクノロジー（PCR Technology）に記載の方法に準じて行うことができる。ハイブリダイゼーション法は、例えばモレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の方法に準じて行うことができる。

4) 上記のハイブリダイゼーション又はPCRによって得られたDNA断片は、その塩基配列を解読することにより、そこにコードされうるアミノ酸配列を知ることができる。該配列を、上記2)で得られたセラミダーゼの部分アミノ酸配列と比較し、上記のDNA断片がセラミダーゼ遺伝子の断片であるかどうかを確

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

認することができる。

5) 3) のハイブリダイゼーション又はPCRによって得られたDNA断片がセラミダーゼ遺伝子の一部であった場合、3) の操作を繰り返すか、あるいは3) で得られたDNA断片の塩基配列をもとに新たなプローブ、プライマーを作製し、これを使用してハイブリダイゼーション又はPCRを実施することにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

6) こうして得られたセラミダーゼ全長をコードする遺伝子を適当なベクターに接続して発現ベクターを構築し、該発現ベクターが導入された形質転換体を作製する。この形質転換体を培養して、培養物中のセラミダーゼ活性を調べることにより、得られた遺伝子がセラミダーゼをコードするものであることを確認することができる。

しかしながら、本発明のセラミダーゼ遺伝子のクローニングにおいて、本発明において得られた部分アミノ酸配列情報ではハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニングに適したプローブDNAを設計することはできなかった。また、部分アミノ酸配列及びライブラリー作製に使用したベクターの塩基配列それぞれから様々なPCRプライマーを設計し、各種組み合わせでPCRを行なったが特異的な増幅は見られず、唯一、部分アミノ酸配列C-53（配列表の配列番号：3にC-53のアミノ酸配列を示す）をもとに設計した2種のプライマー同士の組み合わせのみに増幅が見られた。ただし増幅されたDNA断片P-1（配列表の配列番号：6にP-1の塩基配列を示す）は68 bp と短いものであり、そのままハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニング用プローブとして用いることはできなかった。そこでP-1の配列からさらにPCRプライマーを設計するとともに、これをライブラリー作製に使用されたベクターの塩基配列から設計されたプライマーと組み合わせでPCRを行うことにより、初めてハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニング用のプローブに適していると考えられる335 bpの遺伝子断片を得ることに初めて

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

成功した。

さらに、前記 335 bp の DNA 断片をプローブにして、マウス肝臓由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子をクローニングすることができる。また、マウス肝臓由来のゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼのゲノム DNA を得ることも可能である。

以上のようにして得られる、マウス肝臓の産生するセラミダーゼ遺伝子の全塩基配列は、配列表の配列番号：12 に記載されており、ここにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、配列表の配列番号：13 に記載されている。なお、このアミノ酸配列と当該酵素の N 末端アミノ酸配列より、生体内において当該酵素は N 末端部分のペプチドが除去された成熟型酵素にプロセッシングされることが判明した。この成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列、並びに該配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列表の配列番号：14 及び 15 に示す。上記のアミノ酸配列、塩基配列は、それぞれ公知の哺乳類由来セラミダーゼのアミノ酸配列、塩基配列のそれぞれとの間にはホモロジーはない。すなわち、本発明により提供されるセラミダーゼ遺伝子は公知のセラミダーゼ遺伝子とは関係のない、全く新しい配列からなるものである。

このように、本発明により、マウス肝臓由来のセラミダーゼの一次構造及び遺伝子構造が提供される。更に、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造方法が可能となる。

また、本発明のセラミダーゼ遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検索、検出や増幅等に有用である。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片は、セラミダーゼの検出、同定や精製等において有用である。

また、本発明の細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法によれば、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

織に導入して、細胞及び／又は組織内のセラミド量を調節することができるため、かかる調節方法は、セラミド量の異常に起因する疾患、特に限定されないが、例えば、ファーマー病等の疾患の治療に有用である。

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

#### 実施例 1 セラミダーゼの精製

105匹のSea/ddY マウス（成和実験動物研究所製）から摘出した肝臓181gを1mM EDTAを含む0.25M ショ糖液（ショ糖-EDTA 液）300ml中でホモジナイズした。このホモジネートを600×gで10分間遠心分離した後、上清を回収した。得られた上清を、さらに2700×gで30分間遠心分離し、沈殿を回収した。

沈殿画分を480mlのショ糖-EDTA 液に懸濁して懸濁液を得た。得られた懸濁液を-80℃で凍結した後、流水下で融解した。この凍結、融解処理を2回繰り返した。ついで、処理懸濁液を105000×gで90分間遠心分離し、上清及び沈殿それぞれを回収した。沈殿は、上記同様の凍結、融解～遠心分離の処理に供した。上清を回収して先の上清と合わせ、520mlの粗酵素抽出液を得た。

粗抽出液260mlを20mM リン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化した100mlのDEAE-セファロースFF（アマシャム・ファルマシア社製）カラムにアプライし、非吸着物質を洗浄除去した。ついで、1M NaClを含む同緩衝液による溶出を行い、セラミダーゼ活性画分160mlを回収した。該画分は、続いて1M NaClを含む20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した100mlのフェニル-セファロースFF（アマシャム・ファルマシア社製）カラムにアプライした後、2Mから0MへのNaClの濃度グラジェ



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ントで溶出し、更に0%から1%へのポリドカノール (Polidocanol) (商品名: ルブロールPX、ナカライテスク社製) の濃度グラジエントで溶出した。このクロマトグラフィーにより、310mlのセラミダーゼ活性画分を回収した。

得られた活性画分を、0.5M NaCl及び0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した25mlのキレーティング-セファロースFF (アマシャム・ファルマシア社製、Cu<sup>2+</sup>結合型) カラムにアプライした。カラムを同緩衝液及び0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、2M NH<sub>4</sub>Cl、0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で酵素の溶出を行なった。溶出された活性画分を限外ろ過により濃縮して濃縮物を得た。ついで、濃縮物中の緩衝液を0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に置換し、酵素液を得た。得られた酵素液30mlは、更に0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したポロスHQカラム (φ4.6×100mm、パーセプティブ・バイオシステムズ社製) にアプライした。ついで、0Mから0.5MへのNaClの濃度グラジエントで溶出し、活性画分を得た。この活性画分を0.2M NaCl、0.1%のルブロールPXを含む1mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (φ7.5×100mm、ペンタックス社製) にアプライした。セラミダーゼは、本カラムに吸着せず通過画分に回収された。ついで、該画分を、0.2M NaCl、0.3%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したスーパーコース200HRカラム (φ10×300mm、アマシャム・ファルマシア社製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、精製セラミダーゼを得た。以上の精製操作の結果、58mgの精製セラミダーゼ標品を得た。

なお、得られた精製セラミダーゼ標品の種々の性質について、本明細書に記載のように検討したところ、下記の通りであった。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

作用：セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成した。

基質特異性：前記表1に示すと通りの基質特異性を有した。

至適pH：第1図の結果に示すように、本セラミダーゼの至適pHは、7.0～8.0であった。

温度安定性：0.1% ポリドカノール (Polidocanol) (商品名：ルブロール (Lubrol) PX) を含む20mM トリス-塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37℃、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60℃、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下した。

分子量：SDS-PAGE (還元条件下) により約94kDaであった。またグリコペプチダーゼFにより消化された本酵素は、SDS-PAGE (還元条件下) により約73kDaであった。

## 実施例2 セラミダーゼの部分アミノ酸配列分析

50 pmolのセラミダーゼを含有する試料液1 mlに、0.3%のルブロール PXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた。得られた試料液を、Mono Q PC16/5カラム (100  $\mu$ l、アマシャム・ファルマシア社製) にアプライした。続いて0.4M NaClを含む同緩衝液でカラムに吸着したセラミダーゼ画分を溶出した。この操作により、セラミダーゼを含む画分は、50  $\mu$ lに濃縮された。得られた濃縮液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルをゲルコード・ブルー・ステイン・リジェント (GelCode Blue Stain reagent、ピアス社製) で染色した。ついで、セラミダーゼのバンドを切り出した。切り出されたゲル断片の1/4を0.1% SDSを含む300  $\mu$ lの0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) で37℃、16時間抽出した。得られた抽出液を試料として、G1005Aプロテインシーケンシングシステム (ヒューレット・パッカード社製) を用いて、セラミダーゼのN末端アミノ酸配列解析を行い、アミノ酸配列N-termを決定した。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

。配列表の配列番号：1にN-termのアミノ酸配列を示す。

また、切り出されたゲル断片の残り3/4を、1mlの0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)/50%アセトニトリル中で30℃、45分洗浄した。窒素ガス及び遠心濃縮機を使用してゲルを完全に乾燥させた後、0.5μgのプロテアーゼLys-C(和光純薬社製)を含む10μlの0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)を加え、更にゲルが完全に膨潤するまで0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 9.2)を加えて37℃で16時間保温し、セラミダーゼのプロテアーゼ消化を行なった。反応終了後、150μlの0.1% トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリルを用いて、室温で1時間抽出する操作を2回行なって、抽出液を回収した。この抽出液を逆相クロマトグラフィーに供し、ペプチド断片の精製を行なった。得られたペプチド断片をG1005Aプロテインシーケンシングシステムを用いたエドマン分解法により分析し、部分アミノ酸配列C-46、C-53を決定した。配列表の配列番号：2、3にそれぞれC-46、C-53のアミノ酸配列を示す。

### 実施例3 セラミダーゼ遺伝子を含むDNA断片のPCR法による増幅

実施例2で決定したセラミダーゼの部分アミノ酸配列C-53をもとに、センスミックスプライマー53-S1、アンチセンスミックスプライマー53-A3をデザインし、DNA合成機で合成した。配列表の配列番号：4、5にそれぞれプライマー53-S1、53-A3の塩基配列を示す。これらのプライマーを用いてPCRを行なった。PCRは、マウス肝臓cDNAプラスミドライブラリー(宝酒造社製)を鋳型として行なった。PCRは、94℃、9分の後、94℃、0.5分～51℃、0.5分～72℃、1分を1サイクルとする40サイクルを行い、さらに72℃、7分保温することにより行なった。このPCRにより、約70bpの特異的な増幅DNA断片がアガロース電気泳動で検出された。

この増幅DNAをゲルより回収し、これをpGEM-T easyベクター(

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

プロメガ社製)に組み込み、組換えプラスミドを構築した。該プラスミドの挿入DNA断片の塩基配列解析を行なった結果、この断片の部分塩基配列P-1が決定された。配列表の配列番号: 6にP-1の塩基配列を示す。該配列は実施例2で決定されたセラミダーゼの部分アミノ酸配列C-53に対応する配列であり、目的とするセラミダーゼの遺伝子の一部が取得できたことが確認された。

このP-1の塩基配列をもとに、アンチセンスプライマーMA1及びMA2をデザインして合成した。配列表の配列番号: 7、8にそれぞれプライマーMA1、MA2の塩基配列を示す。また、マウス肝臓cDNAプラスミドライブラリーの構築に用いられたベクターpAP3neoの塩基配列をもとにセンスプライマーT7in及びT7outをデザインし合成した。配列表の配列番号: 9、10にそれぞれプライマーT7in、T7outの塩基配列を示す。これらのプライマーを用いて、マウス肝臓cDNAライブラリーを鋳型としたネスティッドPCRを行なった。1st PCRとして、まずセンスプライマーT7out及びアンチセンスプライマーMA2を使用して94℃、9分の後、94℃、0.5分～51℃、0.5分～72℃、2分を1サイクルとする40サイクルの反応を行ない、さらに72℃、7分間保温した。さらに2nd PCRは、1st PCRの反応液を鋳型とし、センスプライマーT7in及びアンチセンスプライマーMA1を使用する以外は1st PCRと同じ条件で行なった。この結果、335bpの増幅DNA断片が得られた。これを以下に示すコロニーハイブリダイゼーションのプロープとした。

#### 実施例4 セラミダーゼ遺伝子のクローニング

マウス肝臓cDNAプラスミドライブラリーを導入された形質転換体を、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地プレート上のナイロンフィルター(商品名: ハイボンド-N<sup>+</sup>、アマシャムファルマシア社製)に播種し、9.5 × 13.5 cmのプレート1枚当たり約3万個のコロニーを形成させてマスタ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ーフィルターを作製した。このフィルターのレプリカを作製し、得られたレプリカフィルターを10% SDS溶液に浸したろ紙上で5分間；0.5M NaOH、1.5M NaCl溶液に浸したろ紙上で5分間（変性）；3M NaClを含む0.5M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）に浸したろ紙上で5分間（中和）；2×SSC溶液に浸したろ紙上で5分間、それぞれ処理した。ついで、2×SSC溶液でフィルターをリンスした。このフィルターを風乾したのち、紫外線照射によりDNAをフィルターに固定し、コロニーハイブリダイゼーション用のフィルターとした。

ハイブリダイゼーションのプロープとしては、実施例3で得た増幅DNA断片0.1 μg相当をDNAラベリングキット、レディー・トゥー・ゴー（Ready To Go、ファルマシア社製）を用いて、同キットのプロトコールに従って<sup>32</sup>Pで標識したものをを用いた。上記のフィルターをハイブリバッグに入れ、ハイブリダイゼーション溶液（組成：7% PEG 6000、10% SDS溶液）中、60℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上記の標識プロープを0.006 pmol/mlとなるように加え、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。次に、60℃に加温しておいた洗浄液（2×SSC、0.1% SDS）中、60℃で15分間ずつ3回、フィルターを洗浄した。フィルターから余分な水分を除いた後、富士フィルム社製イメージングプレートに20分間感光した後、BAS1000イメージングアナライザー（富士フィルム社製）にてシグナルを検出した。次いで本操作により得られた陽性シグナルに対応するマスターフィルター上のコロニーを採取した（1次スクリーニング）。

採集したコロニーを、100 μg/mlのアンピシリンを含むLB培地に懸濁した後100 μg/mlのアンピシリンを含む9.5×13.5 cm LB寒天培地プレート上のナイロンフィルターに播種し、1枚当たり200～1000個のコロニーを形成させてマスターフィルターを作製した。このフィルターについて、1次スクリーニングと同様の方法により陽性クローンのスクリーニングを行

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

い、さらに同様の操作で3次スクリーニングを実施した。3次スクリーニングの結果、セラミダーゼ遺伝子を含むと考えられる陽性クローンを単離することができた。

この陽性クローンからプラスミドを調製し、これをプラスミドpLCDaseと命名した。該プラスミドを種々の制限酵素、もしくは複数の制限酵素の組み合わせで消化したうえ、生成した各DNA断片をサブクローニングしてその塩基配列を解析した。これにより、プラスミドpLCDaseに挿入されたDNA断片の全塩基配列を決定した。該配列を配列表の配列番号：11に示す。また、該配列中に見出されたオープン・リーディング・フレーム（ORF）の塩基配列、並びにそこにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号：12及び13に示す。さらに、上記のDNA断片の制限酵素地図と、該DNA断片に含有されるオープン・リーディング・フレームの位置を第2図に示す。

上記のORFの塩基配列を解析したところ、ここには実施例2で明らかにされたセラミダーゼの部分アミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれており、このORFがセラミダーゼをコードするものであることが確認された。また、該ORFにコードされるセラミダーゼのアミノ酸配列と、配列表の配列番号：1に示されるセラミダーゼのアミノ酸配列とを比較すると、マウス肝臓より精製されたセラミダーゼは、上記のORFにコードされるポリペプチドのうちのN末端部分のペプチドを欠くことが示された。すなわち、セラミダーゼは、翻訳後にそのN末端部分を除去するプロセッシングを受けて成熟型酵素に変換されることが示された。配列表の配列番号：14に成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列を、また、配列表の配列番号：15に成熟型セラミダーゼをコードする塩基配列をそれぞれ示す。

#### 実施例5 セラミダーゼ遺伝子の発現

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

直径35mmのディッシュに10%FCS含有 $\alpha$ -MEM培地で培養されたCHO細胞( $3 \times 10^5$ 細胞/ディッシュ)に、実施例4で得られたプラスミドpLCDase 1 $\mu$ gと、リポフェクトアミン(ライフ・テクノロジーズ社製)5 $\mu$ lとを加えることにより、セラミダーゼ遺伝子をCHO細胞に導入した。この細胞を37°Cで24時間培養後、0.1% Triton X-100を含む100 $\mu$ lの10mM Tris塩酸(pH7.5)に懸濁し、細胞を破碎した。得られた細胞破碎液について、上記のC12-NBD-セラミドを基質とするセラミダーゼ活性測定を行なったところ、この細胞においてセラミダーゼがpLCDaseを導入していないコントロール細胞に比べて、約1000倍強く発現されていることが確認された。

更に、アナリティカル バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)第24巻、第291~300頁(1997)に記載の方法に従って、細胞内のセラミド量を測定したところ、pLCDaseを導入した細胞では、導入していないコントロール細胞に比べて、セラミド量が有意に減少していることが確認された。

#### 実施例6 マウス脳からのセラミダーゼ遺伝子のクローニング

アンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地プレートにニトロセルロース膜(Schleicher&Schuell社、PROTRAN BA85 0.45mmを直径82mmで使用)をのせ、そのプレート1枚当たり約20万コロニーになるように10枚のプレートにマウス脳cDNAライブラリー(LIFE TECHNOLOGIES社・SUPERScript Mouse Brain cDNA Library)を播種し、37°Cで10時間培養した。ニトロセルロースメンブレン上に生えた大腸菌をナイロン膜(PALL Gelman Laboratory社・バイオダイナ直径82mm(1.2mm))に写し取り、それぞれアンピシリンプレートにのせた後、37°Cで3時間培養した。ニトロセルロースメンブレンは、マスターフィルターとして4°Cで保存し、ナイロン膜はクロラムフェニコール・プレートにのせ37°Cで16時間培養した。ナイロン膜から新しいナイロン膜にコロ

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ニーを写し取り、各組のナイロンを重ねたまま1mlの変性液(0.5M NaOH/1.5M NaCl)で、表と裏それぞれ5分間処理した。同様に1mlの中和液(0.5M Tris-HCl (pH7.4)/1.5M NaCl)で5分間処理した。ナイロン膜を離し、風乾後80℃で2時間ベーキングした。その後、200mlの予洗液(5×SSC/0.5% SDS/1ml EDTA (pH8.0))で10分間振とうし、大腸菌被断片をふき取り、2×SSCで洗浄した。40mlのハイブリダーゼーション液(0.5M チャーチリン酸/7% SDS/1mM EDTA)で、65℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、変性後のプローブを含む40mlのハイブリダイゼーション液中で、65℃で16時間ハイブリダイゼーションを行なった。プローブとして、マウスセラミダーゼ遺伝子を含むプラスミドpAPLCDのEcoRI-EcoRI断片2.7kbpを使用した。ハイブリダイゼーション終了後100mlの洗浄液(40mM チャーチリン酸/1% SDS)で65℃、15分間の洗浄を2回行なった。さらに100mlのHigh stringent 洗浄液(0.2×SSC/0.1% SDS)で65℃、15分間洗浄した。膜を風乾後、1時間IP-plateに暴露し、BAS 1500 で解析を行なった。ポジティブ部分のニトロセルロースメンブレンを直径約6mmに切りだし、1mlのLB培地に懸濁後、4000倍に希釈したサンプル200mlをアンピシリン入りLBプレートにまき、2nd スクリーニングを行なった。

同様にポジティブ部分を10000倍に希釈したサンプル200mlをアンピシリン入りLBプレートにまき、ライブラリーを作製し、このライブラリーを用いて3rd スクリーニングを行なった。単離されたクローン(pSBCD)はサブクローニングした後、定法に従って塩基配列を決定した。その配列を配列番号: 16に示す。

前記配列中には、実施例4に記載のマウス肝臓由来のセラミダーゼ遺伝子と同一の配列を有するORFが見出された。なお、5' 非翻訳領域及び3' 非翻訳領



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

域の配列は、マウス肝臓由来のものとは異なっていた。また、単離されたプラスミド p S B C D を実施例 5 と同様に CHO 細胞に導入したところ、該細胞においてセラミダーゼが発現されていることが確認された。

#### 実施例 7 ヒトのセラミダーゼ遺伝子のゲノムクローニング

実施例 4 で決定したマウス肝臓由来セラミダーゼ遺伝子の配列に基づき、配列表の配列番号：17 に示す配列を有するセンスプライマー U 1 1 0 7 及び配列表の配列番号：18 に示す配列を有するアンチセンスプライマー L 1 3 1 1 を合成した。U 1 1 0 7 プライマーの配列は、配列表の配列番号：12 の塩基番号：1107～1130 の配列に相当し、L 1 3 1 1 プライマーの配列は、配列番号：12 の塩基番号：1311～1334 の配列に相補的な塩基配列に相当する。

ヒト肝臓癌細胞 H u h 7 からゲノム DNA を常法により精製した。得られたゲノム DNA 625 ng を鋳型に U 1 1 0 7 プライマー及び L 1 3 1 1 プライマーを用いて PCR を行なった。PCR は、94℃、9 分の後、94℃、0.5 分～55℃、0.5 分～72℃、3 分を 1 サイクルとする 40 サイクルを行ない、さらに 72℃ で 7 分保温する反応を行なった。ついで、得られた反応物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、この PCR により、約 2 k b p の DNA 断片が増幅されたことが確認された。

この DNA 断片を S e p h a g l a s (ファルマシア社製) を用いて、ゲルから回収し、得られた断片を p G E M - T e a s y ベクター (プロメガ社製) に組込み、組換えプラスミドを構築した。ついで、得られたプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列を決定した。前記配列は、G e n B a n k のデータベースの登録されている A c c e s s i o n N O . A C 0 1 2 1 3 1 C o m p l e m e n t の 9 6 2 8 9 ～ 9 8 4 7 8 に相当する配列であった。また、前記配列にコードされるアミノ酸配列の解析を行なったところ、配列表の配列番号：4 で示されるマウス肝臓由来セラミダーゼアミノ酸配列のアミノ酸番号：370～444 の

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

領域との相同性を示すアミノ酸配列をコードする領域が見出された。

なお、AC012131は、実施例4で決定されたマウス肝臓由来セラミダーゼ遺伝子とも相同性を有する。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号：1に示す配列において、アミノ酸番号：7、9及び13のX a aは不明のアミノ酸を示す。

配列番号：4は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。前記配列中、塩基番号：6、9及び15のnは、G、A、T又はCを示す。

配列番号：5は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。前記配列中、塩基番号：3、6及び15のnは、G、A、T又はCを示す。

配列番号：7は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：8は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：9は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：10は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：11は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：17は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：18は、プライマー用の合成オリゴヌクレオチドの配列である。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼをコードする遺伝子が提供され、また、該遺伝子を用いるセラミダーゼの遺伝子工学的な製造方法が提供される。また、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ及びプライマーは、前記遺伝子の検出に有用であり、生体内におけるセラミド代謝研究などに応用される。さらに、本発明により、本発明の遺伝子のアンチセンス核酸（DNA、RNA）が提供される。かかる遺伝子およびそのアンチセンス核酸は、生体内に

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

おけるセラミダーゼ活性の制御、セラミド代謝系の調節に有用であり、セラミド量の異常に起因する疾患の治療などへの応用が可能なセラミド量の調節方法が提供される。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

## 請求の範囲

1. (A) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

(B) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列又はその一部を有する核酸であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

(C) 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列において、少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換を有するアミノ酸配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；

(D) 配列表の配列番号：15に記載の塩基配列において、少なくとも1つの塩基の欠失、付加、挿入又は置換を有する塩基配列からなり、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸；並びに

(E) 前記(A)～(D)いずれか記載の核酸の相補鎖とストリンジェントな条件下にハイブリダイズしうる核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、

(F) 縮重を介して、前記(A)～(E)いずれか記載の核酸とは異なる塩基配列を有する核酸であって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしてなる核酸、

からなる群より選択された核酸の塩基配列を有する遺伝子。

2. ポリペプチドのセラミダーゼ活性が、下記ステップ：

(a) 遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20  $\mu$ l の25 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中、550 pmolのC12-NBD-セラミド、及び1.0 % (W/V) コール酸ナトリウム〕中、37℃で30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

(b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、

により検出されうる、請求項1記載の遺伝子。

3. ポリペプチドが、少なくとも下記性質：

- (i) 作用：セラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸とを生成する；
  - (ii) 基質特異性：N-アシルスフィンゴシンを加水分解する；ガラクトシルセラミド、スルファチド、GM1a、スフィンゴミエリンには作用しない；
  - (iii) 至適pH：7.0～8.0である；
  - (iv) 0.1% ポリドカノール (polidocanol)を含む20mMトリス-塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37℃、24時間処理した場合には活性の低下は見られないうが、60℃、1時間の処理により処理前の活性の約30%に活性が低下する；
- を呈する、請求項1又は2記載の遺伝子。

4. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子を含有してなる組換えDNA。

5. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又は請求項4記載の組換えDNAを含有してなる、微生物、動物細胞又は植物細胞用発現ベクター。

6. 請求項5記載の発現ベクターを保持してなる形質転換体。

7. セラミダーゼ遺伝子が発現され、かつ該遺伝子にコードされたポリペプチドの生産に適する条件下に、請求項6記載の形質転換体を培養し、得られた培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

8. 配列表の配列番号：14に記載のアミノ酸配列又はその一部を有してなるポリペプチドであって、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチド。
9. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子によりコードされてなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド。
10. セラミダーゼ活性が、下記ステップ：
- (a) 遺伝子の発現産物を、反応混合液〔組成：20  $\mu$ l の25 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中、550 pmolのC12-NBD-セラミド、及び1.0 %（W/V） コール酸ナトリウム〕中、37℃で30分間インキュベートして反応させるステップ、並びに
- (b) 得られた反応物について、C12-NBD-脂肪酸の生成を検出するステップ、
- により、検出されうる、請求項8又は9記載のポリペプチド。
11. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA。
12. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA。
13. 請求項11記載のアンチセンスDNAを含有してなる発現ベクター。
14. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー。

WO 00/58448

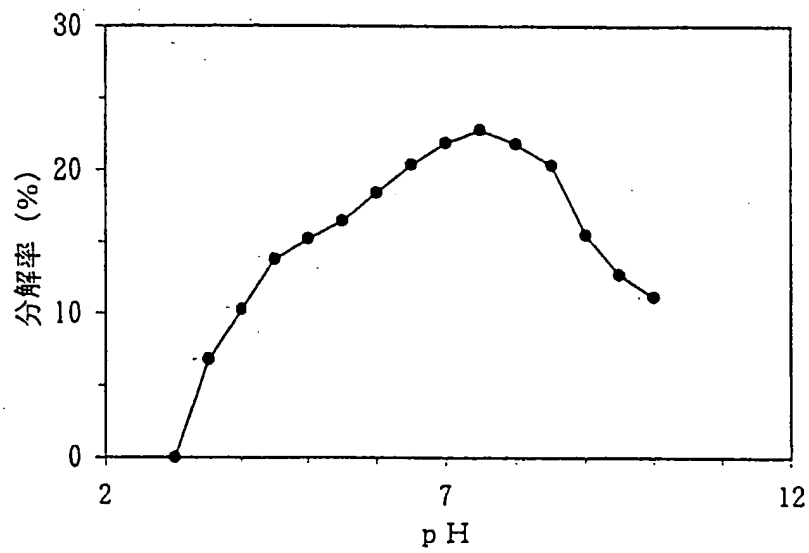
PCT/JP00/01802

15. 請求項8～10いずれか記載のポリペプチドに特異的に結合しうる抗体又はその断片。
16. 請求項14記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出方法。
17. 請求項14記載のオリゴヌクレオチドプローブ及び／又はプライマーを含有してなる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の検出に用いるためのキット。
18. 請求項15記載の抗体又はその断片を使用する、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出方法。
19. 請求項15記載の抗体又はその断片を含有してなるセラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出に用いるためのキット。
20. 請求項1～3いずれか記載の遺伝子又はそのアンチセンス核酸を細胞及び／又は組織に導入し、それにより細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量を調節することを特徴とする、細胞内及び／又は組織内におけるセラミド量の調節方法。

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

第 1 図

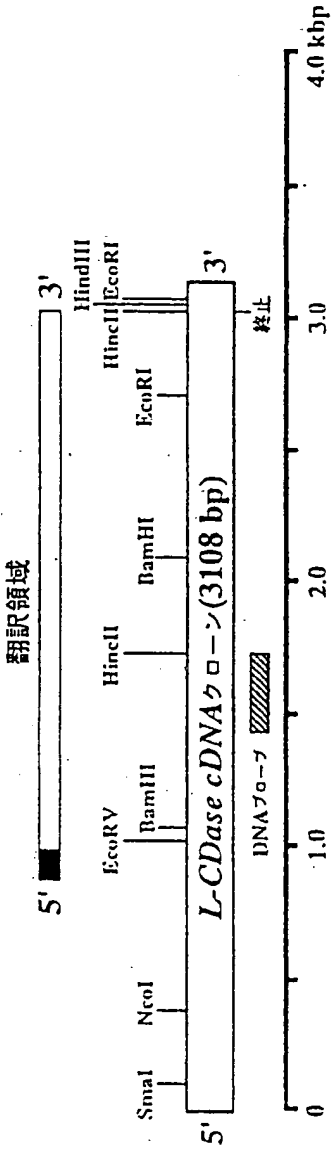




WO 00/58448

PCT/JP00/01802

第 2 図



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A gene encoding ceramidase

<130> 00-011-PCT

<140> JP 11/84743

<141> 1999-3-26

<160> 18

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 7, 9, 13

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 1

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Xaa Val Xaa Arg Ala Asp Xaa Thr Gly

1 5 10 15

Lys Val Asn Asp Ile Asn

20

<210> 2

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

<211> 10

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 9

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 2

Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Xaa Met

1 5 10

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<222> 29, 30

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 3

Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly Pro Phe Val Asn Gly Phe Ala Ser

1 5 10 15

Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro Xaa Xaa

20 25 30

Val Asn Thr Gly Glu

35

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<220>

<222> 6. 9. 15

<223> "n" is G or A or T or C.

<400> 4

carggncnt tygtngc

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<220>

<222> 3. 6. 15

<223> "n" is G or A or T or C.

<400> 5

ggncnagda trttngg

17

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

gcaggctttg ctatcatcaaa tctcgagac gtgtcacc

38

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer.

<400> 7

ttgatgaagc aaagcctgc

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 8

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

ggtgacacgt ctccgagat

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 9

taatacgact cactataggg

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 10

tctgtcttaa aagctgc

17

<210> 11

<211> 3108

<212> DNA

<213> Mouse

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

&lt;400&gt; 11

ccitgcgccac ttctctctcc cggctcaatc gcgagcctt ttctctccc cgtctgccg 60  
ctgccgccat ctccaccct gcctgcccc ggggtctgtg gacgccggg cagagagcaa 120  
gcaccgagct gggcctgtg gagaccggag accagcgcc cggccccc cccgtgcga 180  
gcctctgag cagctccga acagcttact ttctgttcc atctcttctg gaccgggtg 240  
gcctctcaa aagccattc tcctaactt tatcaaggtt caaaggctaa aggtctgtac 300  
acatgagtgc tgggtgtctt agaggcatcg ggtcccttct agctggagt gcagtactg 360  
tgagtccat ggaatccaaa ttggcaaga gatacaatct aaactctcaa ctactccaga 420  
ttcaaggtc acctcacttt ctggtacca aaggagcttt gcggggccgc tctgacatcc 480  
agtagattg gaaacacatt gagaaatcag cctgagcaac ctgcaaggca caaggcaca 540  
gattctgcat ggtatttgc tctccagga ggtgaacct tgtttgatt cacagagta 600  
gggttgagat gccagttgt tctcatctt ggctcagaag aagcacctag gaataaaagc 660  
tctaagctgg tattaagtag aatgggctta aagtcacta caggaaaca cagctagtga 720  
cagaaatggc aaagcgaacc ttctccactt tggaggcatt cctcatttct ctctggtaa 780  
taatgacagt catcacagt gcccttctca ccctcttgtt tgtaccagt gggaccattg 840  
aaaaccaca agattcagga aatcactggt ttcaaccac tctgggctcc acgacaacc 900  
agccccctcc aattacacag actccaaact tcccttctt tgggaacttc agtggtact 960  
acattggcgt tgggagagcg gattgcacag gacaagtgtc agatatcaat ttgatgggt 1020  
atggcaaaaa tggccagaat gcacgggtc tctcaccag gctgttcagc cgtgtttta 1080  
tcttggcgga tccagatggg tcaaatcgaa tggcatttgt gagcgtgga ctatgtatga 1140  
tttcccaacg actgaggtt gaggtctga agagactaga gataaatat ggctctctgt 1200  
atcgaagaga caatgtatc ctgagtcca ttcacaca ctctggcca gcagggttt 1260  
tccaatatac actctatata ctgccagcg agggattcag caaccggacc ttctagtaca 1320  
tagtctctgg gatcatgaag agcattgata tagctcacac aaatcttaaa ccaggcaaaa 1380  
tctttatcaa caaaggaaat gttgctaag tgcagatcaa ccgaagcccc tctcttacc 1440  
ttctgaatcc acagtcagag agagcaagg attcttcaa cacagacaag gaaatgctg 1500  
tcttgaact ggtggattt aatggagaag acttgggtct tatcagctg tttgcatcc 1620  
accccgtag catgaacaat agcaaccact ttgtgaatag tgacaatat ggctatgcg 1620  
cttaccttt tgagcaagaa aagaacaaag gctatctgcc tggacagga ccgtttgtg 1680

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

caggctttgc ttcataaat ctggagacg tgcacccaa cattcttggc ccgatttg 1740  
 tcaacacagg ggagtctgt gacaacgaca agagcacctg tccaacggt gggcctagca 1800  
 tgtgatggc cagcggacct ggacaagaca tgtttgagag cacacacatt ataggacgga 1860  
 tcatctatca gaaggccaag gagctgtatg cctctgcctc ccaggagtg accggcccag 1920  
 tgcttgacg tcaccagtgg gtgaacatga cagatgtgag cgtccagctc aatgccacac 1980  
 acacagtga gacgtgtaaa cctgccctgg gctacagttt tgccgcaggc acaattgatg 2040  
 gagtttcggg cctcaatatt acacaggga ctacggaagg ggatccattc tgggacactc 2100  
 ttccggacca gctcttggga aaaccatctg aagagattgt agagtgtcag aaacccaaac 2160  
 caatcctgct tcacagtga gagctgacga taccacatcc ttggcaacca gatattgttg 2220  
 atgttcagat tgttaccgtt gggctcttgg ccatagctgc tatccctggg gaattaacaa 2280  
 ccatgtcggg acgaagattt cgtgaggcaa ttaaaaaaga atttgactt tatgggatga 2340  
 aggatatgac cgttgttatc gcaggcttaa gcaatgttta tacacattac attaccacat 2400  
 atgaagaata ccaggctcag cggtagcagg cagcatctac aatctatga ccacacacc 2460  
 tgtctgcata catccaactc ttcagagacc ttgctaaggc aattgctacg gacacagtag 2520  
 ccaacatgag cagtgttccc gagcctccat tcttcaaaaa tctaatactg tcaattattc 2580  
 ctaattattg gatagagca ccaattggca aacatttttg gtagtcttg cagccagcaa 2640  
 aacctgaata cagagtggga gaagtgttg aagttatatt ttaggcgct aacccaaaga 2700  
 attcagcaga gaaccagacc catcaacct tctcactgt ggagaaatac gaggactctg 2760  
 tagctgactg gcagataatg tataacgat cctcctggga gacgaggttt tattggcaca 2820  
 aaggaatact gggcttgagc aatgcaaca tatactggca tattccagat actgcctacc 2880  
 ctggaatcta cagaataaga tttttggac acaatcgga gcaggaactt ctgaaaccg 2940  
 ctgtcactat agcatttgaa ggaatttctt ctccttttga agttgtcact acttagtgaa 3000  
 aagttgacag atattgaaga aaagcttttc tctgtgcaca ttatagagt aattcacaaa 3060  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 3108

<210> 12

<211> 2271

<212> DNA

<213> Mouse



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

&lt;400&gt; 12

atggcaaagc gaaccttctc caccttggag gcattcctca ttttcttct ggtaataatg 60  
acagtcatca cagtggccct ttcacccctc ttgtttgtta ccagtgggac cattgaaaac 120  
cacaaagatt caggaaatca ctggttttca accactctgg gctccacgac aaccagccc 180  
cctccaatta cacagactcc aaacttccct tcatttcgga acttcagtgg ctactacatt 240  
ggcgttggga gagcggattg cacaggacaa gtgtcagata tcaatttgat gggctatggc 300  
aaaaatggcc agaatgcacg ggtctcctc accaggctgt tcagccgtgc tttatcttg 360  
gcggaicccag atgggtcaaa tcgaatggca ttgtgagcg tggaactatg tatgatttcc 420  
caacgactga ggttggaggt cctgaagaga ctagagagta aatatggctc tctgtatcga 480  
agagacaatg ttatcctgag tgccattcac acacactctg gccagcagg gtttttcaa 540  
tataactct atatactgc cagcgaggga ttacgaacc ggacctttca gtacatagtc 600  
tctgggatca tgaagagcat tgatatagct cacacaaatc ttaaaccagg caaatcttt 660  
atcaacaaag gaaatgttc taatgtgcag atcaaccgaa gccctcctc ttacctctg 720  
aatccacagt cagagagagc aaggtattct tcaaacacag acaaggaaat gctggtctg 780  
aaactggtg atttgaatgg agaagactg ggtcttatca gctggttgc catccacccc 840  
gtgagcatga acaatagcaa ccactttgtg aatagtga atattgggta tgcggcttac 900  
ctttttgagc aagaaaagaa caaaggctat ctgcctggac agggaccgtt ttagcaggc 960  
tttcttcat caaatctcg agacgtgtca ccaacattc ttggcccgca ttgtgtcaac 1020  
acaggggagt ctgtgacaa cgacaagagc acctgtcca acggtgggccc tagcatgtgc 1080  
atggccagcg gacctggaca agacatgttt gagagcacac acattatagg acggatcatc 1140  
tatcagaagg ccaaggagct gtatgcctct gcctcccagg aggtgaccgg ccagtgctt 1200  
gcagctcacc agtgggtgaa catgacagat gtgagcgtcc agtcaatgc cacacacaca 1260  
gtgaagacgt gtaaacctgc cctgggctac agttttgcc caggcacaat tgatggagtt 1320  
tcgggcctca atattacaca gggaactacg gaaggggac cattctggga cactcttcgg 1380  
gaccagctct tgggaaaacc atctgaagag attgtagagt gtcagaaacc caaaccaatc 1440  
ctgcttcaca gtgagagct gacgatacca catccttggc aaccagatat tgttgatgtt 1500  
cagattgtta ccgttgggtc ctggccata gctgctatcc ctgggaatt aacaacatg 1620  
tcgggacgaa gatctcgtga ggcaattaaa aaagaattg cactttatgg gatgaaggat 1620

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

atgaccgttg ttatcgagg tctaagcaat gttatacac attacattac cacatatgaa 1680  
 gaataccagg ctacagcgga cgaggcagca tctacaatct atggaccaca caccctgtct 1740  
 gcatacatcc aactcttcag agaccttgct aaggcaattg ctacggacac agtagccaac 1800  
 atgagcagtg gtcccagacc tccattcttc aaaaatctaa tagcttcact tttcctaata 1860  
 attgcggata gagcaccaat tggcaaacaat tttggggatg tcttgagcc agcaaacct 1920  
 gaatacagag tgggagaagt ggttgaagtt atattttag gcgctaacc aaagaattca 1980  
 gcagagaacc agacccatca aaccttcctc actgtggaga aatacgagga ctctgtagct 2040  
 gactggcaga taatgtataa cgatgcctcc tgggagacga ggttttattg gcacaaagga 2100  
 atactgggtc tgagcaatgc aacaatatac tggcatattc cagatactgc ctaccctgga 2160  
 atctacagaa taagatattt tggacacaat cggaagcagg aacttctgaa acccgctgtc 2220  
 atactagcat ttgaaggaat ttcttctct tttgaagttg tcactactta g 2271

<210> 13

<211> 756

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Met	Ala	Lys	Arg	Thr	Phe	Ser	Thr	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Ile	Phe
1				5				10					15	
Leu	Leu	Val	Ile	Met	Thr	Val	Ile	Thr	Val	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu
				20				25					30	
Leu	Phe	Val	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Asn	His	Lys	Asp	Ser	Gly
				35				40					45	
Asn	His	Trp	Phe	Ser	Thr	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Gln	Pro
				50				55					60	
Pro	Pro	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Asn	Phe	Pro	Ser	Phe	Arg	Asn	Phe
				65				70					75	
Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Val	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Thr	Gly	Gln

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

80	85	90
Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln Asn		
95	100	105
Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile Leu		
110	115	120
Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val Glu		
125	130	135
Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys Arg		
140	145	150
Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val Ile		
155	160	165
Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe Gln		
170	175	180
Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg Thr		
185	190	195
Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile Ala		
200	205	210
His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly Asn		
215	220	225
Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu		
230	235	240
Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp Lys		
245	250	255
Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp Leu		
260	265	270
Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn Asn		
275	280	285
Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala Tyr		
290	295	300

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly			
	305	310	315
Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser			
	320	325	330
Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser Cys			
	335	340	345
Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met Cys			
	350	355	360
Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His Ile			
	365	370	375
Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala Ser			
	380	385	390
Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln Trp			
	395	400	405
Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His Thr			
	410	415	420
Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala Gly			
	425	430	435
Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr Thr			
	440	445	450
Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu Gly			
	455	460	465
Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro Ile			
	470	475	480
Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln Pro			
	485	490	495
Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala Ile			
	500	505	510
Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg Phe			

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

515	520	525
Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys Asp		
530	535	540
Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His Tyr		
545	550	555
Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala Ala		
560	565	570
Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln Leu		
575	580	585
Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Asn		
590	595	600
Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile Ala		
605	610	615
Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys His		
620	625	630
Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val Gly		
635	640	645
Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn Ser		
650	655	660
Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys Tyr		
665	670	675
Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala Ser		
680	685	690
Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu Ser		
695	700	705
Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro Gly		
710	715	720
Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu Leu		
725	730	735

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser Pro

740

745

750

Phe Glu Val Val Thr Thr

755

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 682

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 14

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Cys Thr Gly

1

5

10

15

Gln Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln

20

25

30

Asn Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile

35

40

45

Leu Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val

50

55

60

Glu Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys

65

70

75

Arg Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val

80

85

90

Ile Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe

95

100

105

Gln Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg

110

115

120

Thr Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile

125

130

135

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

Ala His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly			
	140	145	150
Asn Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu			
	155	160	165
Leu Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp			
	170	175	180
Lys Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp			
	185	190	195
Leu Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn			
	200	205	210
Asn Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala			
	215	220	225
Tyr Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln			
	230	235	240
Gly Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val			
	245	250	255
Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser			
	260	265	270
Cys Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met			
	275	280	285
Cys Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His			
	290	295	300
Ile Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala			
	305	310	315
Ser Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln			
	320	325	330
Trp Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His			
	335	340	345
Thr Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala			

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

350	355	360
Gly Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr		
365	370	375
Thr Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu		
380	385	390
Gly Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro		
395	400	405
Ile Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln		
410	415	420
Pro Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala		
425	430	435
Ile Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg		
440	445	450
Phe Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys		
455	460	465
Asp Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His		
470	475	480
Tyr Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala		
485	490	495
Ala Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln		
500	505	510
Leu Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala		
515	520	525
Asn Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile		
530	535	540
Ala Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys		
545	550	555
His Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val		
560	565	570



WO 00/58448

PCT/JP00/01802

Gly Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn  
 575 580 585  
 Ser Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys  
 590 595 600  
 Tyr Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala  
 605 610 615  
 Ser Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu  
 620 625 630  
 Ser Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro  
 635 640 645  
 Gly Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu  
 650 655 660  
 Leu Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser  
 665 670 675  
 Pro Phe Glu Val Val Thr Thr  
 680

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2049

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 15

ttcagtggct actacattgg cgttgggaga gcgattgca caggacaagt gtcagatatc 60  
 aatttgatgg gctatggcaa aaatggccag aatgcacggg gtctctcac caggctgttc 120  
 agccgtgctt ttatcttggc ggatccagat gggtaaatac gaatggcatt tgtgagcgtg 180  
 gaactatgta tgatttccca acgactgagg ttggagggtcc tgaagagact agagagtaaa 240  
 tatggctctc tgtatcgaag agacaatgtt atcctgagtg ccattcacac acactctggc 300  
 ccagcagggt ttttccaata tacactctat atactcgcca gcgagggtt cagcaaccgg 360

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

acctttcagt acatagtctc tgggatcatg aagagcattg atatagctca cacaaatctt 420  
 aaaccaggca aaatctttat caacaaagga aatgttgcta atgtgcagat caaccgaagc 480  
 ccttctcttt accttctgaa tccacagtca gagagagcaa ggtattcttc aaacacagac 540  
 aaggaaatgc tggctctgaa actggtggat ttgaatggag aagacttggg tcttatcagc 600  
 tggtttgcca tccaccccggt gagcatgaac aatagcaacc accttctgaa tagtgacaat 660  
 atgggctatg cggcttacct ttttgagcaa gaaaagaaca aaggctatct gcctggacag 720  
 ggaccgtttg tagcaggctt tgcttcatca aatctcggag acgtgtcacc caacattctt 780  
 ggcccgcatg gtgtcaacac aggggagtct tgtgacaacg acaagagcac ctgtcccaac 840  
 ggtgggccta gcatgtgcat ggccagcgga cctggacaag acatgtttga gagcacacac 900  
 attataggac ggatcatcta tcagaaggcc aaggagctgt atgcctctgc ctcccaggag 960  
 gtgaccggcc cagtgtctgc agctcaccag tgggtgaaca tgacagatgt gagegtccag 1020  
 ctcaatgcca cacacacagt gaagacgtgt aaacctgccc tgggctacag ttttgccgca 1080  
 ggcacaattg atggagtctt gggcctcaat attacacagg gaactacgga aggggatcca 1140  
 ttctgggaca ctcttcggga ccagctcttg ggaaaacct ctgaagagat ttagagtgt 1200  
 cagaaaccca aaccaatcct gcttcacagt ggagagctga cgataccaca tccttggcaa 1260  
 ccagatattg ttgatgttca gattgttacc gttgggtcct tggccatagc tgctatccct 1320  
 ggggaattaa caaccatgtc gggacgaaga tttcgtgagg caattaaaa agaatttgca 1380  
 ctttatggga tgaaggatat gaccgttgtt atcgaggctc taagcaatgt ttatacacat 1440  
 tacattacca catatgaaga ataccaggct cagcggtagc aggcagcatc tacaatctat 1500  
 ggaccacaca cctgtctgc atacatccaa ctcttcagag accttgctaa ggcaattgct 1620  
 acggacacag tagccaacat gagcagtgtt cccgagcctc cattcttcaa aaatctaata 1620  
 gcttcactta ttcttaatat tgcggataga gcaccaattg gcaaacattt tggggatgtc 1680  
 ttgcagccag caaacctga atacagagt ggagaagtgg ttgaagtat attttaggc 1740  
 gctaacccea agaattcagc agagaaccag acccatcaaa ccttctcac tgtggagaaa 1800  
 tacgaggact ctgtagctga ctggcagata atgtataacg atgcctcctg ggagacgagg 1860  
 ttttattggc acaaaggaat actgggtctg agcaatgcaa caatatactg gcatattcca 1920  
 gatactgcct accttggat ctacagaata agatattttg gacacaatcg gaagcaggaa 1980  
 ctctgaaac ccgctgtcat actagcattt gaaggaattt ctctccttt tgaagtgtc 2040  
 actacttag 2049

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 4835

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 16

```

cctgcagcgg tgttctgaag agccgggcag aggatacaca agcatcccag caggcactct 60
ggtttgcccg tgaacgatag atatgcgggg gtttgaatga gcagctgcag cagcgggttt 120
gggtctgtac acatgagtcg tgggtgtcct agaggcatcg ggtcccttct agctggagtt 180
gcagtacttg tgagtgccat atttggaaac acattgagaa atcagcctga gcaacctgca 240
aggcacaagg cacaagattc tgcatggta tttgctctcc caggaggtga acacttggtt 300
tgattaacag agtcagggtt gagatgccca gttgttcctc atcttggtc agaagaagca 360
cctaggaata aaagctctaa gctggtatta agtagaatgg gcttaaagtc cactacagga 420
aacaacagct agtgacagaa atggcaaagc gaaccttctc caccttgag gcattcctca 480
tttctctctt ggtaataatg acagtcacat cagtggccct tctcacctc ttgtttgta 540
ccagtgggac cattgaaaac cacaagatt caggaaatca ctggttttca accactctgg 600
gtccacgac aaccagccc cctccaatta cacagactcc aaacttcct tcatttcgga 660
acttcagtgg ctactacatt ggcgttggga gagcagattg cacaggacaa gtgtcagata 720
tcaatttgat gggctatggc aaaaatggcc agaatgcacg ggtctcctc accaggctgt 780
tcagccgtgc ttttatcttg gcgatccag atgggtcaaa tcgaatggca tttgtgagcg 840
tggaactatg tatgatttcc caacgactga ggttggaggt cctgaagaga ctagagagta 900
aatatggctc tctgtatcga agagacaatg ttatcctgag tgccattcac acacactctg 960
gcccagcagg gtttttcaa tataactct atatactgc cagcgaggga ttcagcaacc 1020
ggaccttca gtacatagtc tctgggatca tgaagagcat tgatatagct cacacaaatc 1080
ttaaaccagg caaatcttt atcaacaaag gaaatgttgc taatgtgcag atcaaccgaa 1140
gccccctcct ttacctctg aatccacagt cagagagagc aaggtattct tcaaacacag 1200
acaaggaaat gctggtcttg aaactggtg atttgaatgg agaagacttg ggtcttatca 1260
gctggtttgc catccacccc gtgagcatga acaatagcaa ccactttgtg aatagtgaca 1320

```

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

atatgggcta tgcggcttac ctttttgagc aagaaaagaa caaaggctat ctgcctggac 1380  
agggaccgtt ttagcagcg tttgcttcat caaatctcgg agacgtgtca cccaacattc 1440  
ttggcccga tttgtcaac acaggggagt cttgtgacaa cgacaagagc acctgtcca 1500  
acggtgggcc tagcatgtgc atggccagcg gacctggaca agacatgttt gagagcacac 1560  
acattatagg acggatcatc tatcagaagg ccaaggagct gtatgcctct gcctcccagg 1620  
aggtgaccgg cccagtgcct gcagctcacc agtgggtgaa catgacagat gtgagcgtcc 1680  
agctcaatgc cacacacaca gtgaagacgt gtaaacctgc cctgggttac agttttgccg 1740  
caggcacaat tgatggagtt tcgggcctca atattacaca gggaactacg gaaggggac 1800  
cattctggga cactcttcgg gaccagctct tgggaaaacc atctgaagag attgtagagt 1860  
gtcagaaacc caaaccaatc ctgcttcaca gtggagagct gacgatacca catccttggc 1920  
aaccagatat tgttgatgtt cagattgita ccgttgggtc cttggccata gctgctatcc 1980  
ctggggaatt aacaaccatg tcgggacgaa gatttcgtga ggcaattaaa aaagaatttg 2040  
cactttatgg gatgaaggat atgaccgttg ttatcgagg tctaagcaat gttatacac 2100  
attacattac cacatatgaa gaataccagg ctacagcgta cgaggcagca tctacaatct 2160  
atggaccaca caccctgtct gcatacatcc aactcttcag agaccttgct aaggcaattg 2220  
ctacggacac agtagccaac atgagcagtg gtcccgagcc tcattcttc aaaaatctaa 2280  
tagcttcact tattcctaatt attgcggata gacaccaat tggcaaacat tttggggatg 2340  
tcttgcagcc agcaaaacct gaatacagag tgggagaagt ggttgaagtt atattttag 2400  
gcgctaacc aaagaattca gcagagaacc agaccatca aaccttcctc actgtggaga 2460  
aatacgagga ctctgtagct gactggcaga taatgtataa cgatgcctcc tgggagacga 2520  
ggttttattg gcacaaagga atactgggtc tgagcaatgc aacaatatac tggcatattc 2580  
cagatactgc ctaccctgga atctacagaa taagatattt tggacacaat cggaagcagg 2640  
aacttctgaa acccgctgtc atactagcat ttgaaggaat ttcttctct tttgaagttg 2700  
tcactactta gtgaaaagtt gacagataat gaagaaaagc ttttctctgt gcacattata 2760  
gagtgaattc acacaaatgt gaactgccag tttaatttct gtaattgtct ctgtttggg 2820  
gacaggtcat ttattgctaa tgggacagag gtatgtgttt gtgttgtgt atgattatga 2880  
gtatgcatgc taacaggaag agagaggag gaggagggga ggagggggag ggaggggaaga 2940  
aaggagggag agagagagt agagaatgag agagagagt agagagaaag agttattagt 3000  
gagcaagaga atatgagaga agggccactg acaaccaa atcttgtgat cttatccta 3060

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

aagcatgatt ttccitgaag ctctgtggtt gtttaagaga taattccctc taatatgaaa 3120  
tccttgaat ataatacag tatttgaaga tatgtgaata atgttatcc tatttatita 3180  
tagacttact aaatgagaac actagagaac ttctagaag tcctctagaa tgatacttga 3240  
ttttacagag aggaaaagga gctttgattc tctttaggtt agaataaggt tagtatattt 3300  
ttccctagtc atatttacaa aataccatgt aactttacta caaatatttg agcccagcta 3360  
aaatatacc agaaaattag cataccagtt ttgttttgtt ttattttgtt ttgcatcca 3420  
aacaagcata gtccttctga taagtcactt tagaatggat ctgcctggct cagggttatt 3480  
gttcagtctc agatcatttc cgcaattacc tcagagtcc aactatgcga atgtcacttg 3540  
cagtgccttg atttatgcct tgtattcctc aaagtgtcct tctctgcta agtcacacct 3600  
cttctccca gcatttactc taaatgattt ttaatgtttt cgccaatcaa atgtacctca 3660  
cattacaaag ctttgccttg aatgtagatt tttaaaca aagtgttaag gctggaaatg 3720  
tagttatcaa agaggaagtt ttaaatgtat ctgttctttt atcagctact ccttccctca 3780  
tggctccctt gaatcactga atagtattt aaaccacat atccaatatg gtactcattc 3840  
ctgggtcttc acaattacag acatcatatc gaaatgattg ggctgacaat tcctttgaag 3900  
gacaaagtaa atatttaag agaaatatag attctggaga ggcatttgaa aatcacaaat 3960  
gttacgctc catttctgt ttccaggct ggggttctg atttggagg aaagcagccc 4020  
caaataattt ttaaatatga atctgaaaat aatgttttag aaattatgat ctgcacagtc 4080  
taattaatga gaattgtctg aaagtcctag ctgcatttaa aattatgtaa gttaactaaa 4140  
gccaatttt gaacccagc cataatttg taggtaggta aaaagagcat ttaggagga 4200  
aaccgaactt catttcaaga ctgaatctgt tttaaagaa caatagtgtt aaggtaaact 4260  
ttcatttatt tccctatggt ttacctattt aaacatcga gattgaatca aaaggcacct 4320  
ggagcatatt ttgtaactc catttccac ttggtagttc tatggatgct aactgctgaa 4380  
gaataaactg atcgggattt tcaagggtg tgaacatgtc tctgatggg aataccgtat 4440  
taagtataaa ggttcaaat agttgatctc aaaactatac acacacacac aatatatata 4500  
tatatacaca cacacacatg tacacacaca cacacatgca catacacatg gtattgttta 4560  
aaatttattt ctcatgactt agaacaatat aaggattata caaggattca ttcccacca 4620  
tcatttctcc cagtgaagct ttctcaaag tctgagtagg agtttctct ttctcactgg 4680  
taactatccc acagtggcca ttacatcact agtaatcggg gtgccagcc ctgcatggaa 4740  
ataaatcaca gaaacataat ttcccagtag acttagtctc ttcaagcctg tgtgttcta 4800

WO 00/58448

PCT/JP00/01802

gtgtataaaa tctgtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

4835

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 17

gtttgagagc acacacatta tagg

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide for primer

<400> 18

atattgaggc ccgaaactcc atca

24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BAWAB, S. E. et al., "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (September, 1999, Vol.274, No.39, pp.27948-27955	1-19
P, X	TANI, M. et al., "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (April, 1999), Vol.125, No.4, pp.746-749	1-19
Y	YADA, Y. et al., "Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995), Vol.270, No.21, pp.12677-12684	1-19
Y	NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. et al., "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 $\beta$ ", J. Biol. Chem. (1997), Vol.272, No.30, pp.18718-18724	1-19
Y	HUWILER, A. et al., "Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells", J. Biol. Chem. (12 March, 1999), Vol.274, No.11, pp.7190-7195	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
16 June, 2000 (16.06.00)Date of mailing of the international search report  
04 July, 2000 (04.07.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 10-257884, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 29 September, 1998 (29.09.98), (Family: none)	1-19



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01802

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 20 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO0/01802									
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. <sup>7</sup> C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. <sup>7</sup> C12N9/80, C12N15/55, C12N15/63, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12Q1/68, C12Q1/34, C07K16/40, G01N33/53</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width: 60%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width: 25%;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, X</td> <td>BAWAB, S. E. et al. "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (9月. 1999) 第274巻, 第39号 p. 27948-27955</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>TANI, M. et al. "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (4月. 1999) 第125巻, 第4号 p. 746-749</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	P, X	BAWAB, S. E. et al. "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (9月. 1999) 第274巻, 第39号 p. 27948-27955	1-19	P, X	TANI, M. et al. "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (4月. 1999) 第125巻, 第4号 p. 746-749	1-19
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
P, X	BAWAB, S. E. et al. "Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain", J. Biol. Chem. (9月. 1999) 第274巻, 第39号 p. 27948-27955	1-19									
P, X	TANI, M. et al. "Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBD-ceramide", J. Biochem. (4月. 1999) 第125巻, 第4号 p. 746-749	1-19									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p> </div> </div>											
<p>国際調査を完了した日 16. 06. 00</p>		<p>国際調査報告の発送日 04.07.00</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 印</p> <p>4 B 9 7 3 5</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>									

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01802

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 20 は、人の身体の治療による処置方法であるから、  
この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01802

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YADA, Y. et al. "Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin", J. Biol. Chem. (1995) 第270巻, 第21号 p. 12677-12684	1-19
Y	NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. et al. "Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 $\beta$ ", J. Biol. Chem. (1997) 第272巻, 第30号 p. 18718-18724	1-19
Y	HUWILER, A. et al. "Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells", J. Biol. Chem. (12日. 3月. 1999) 第274巻, 第11号 p. 7190-7195	1-19
A	JP, 10-257884, A(寶酒造株式会社) 29. 9月. 1998 (29. 09. 98) パテントファミリー無し	1-19